

南亚实蝇鞣化激素基因的克隆与表达分析

张贺贺, 张琪文, 林 嘉, 季清娥, 陈家骅*

(福建农林大学益虫研究所, 联合国(中国)实蝇防控研究中心, 闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室,
生物农药与化学教育部重点实验室, 福州 350002)

摘要:【目的】克隆南亚实蝇 *Zeugodacus tau* 鞣化激素基因, 分析其分子特征及时空表达模式, 为探索其生理功能奠定基础。【方法】利用同源克隆和 RACE 技术从南亚实蝇刚羽化成虫中克隆鞣化激素基因 *bursicon-α* 和 *bursicon-β* 的全长 cDNA 序列, 并用邻接法 (neighbor-joining method) 与其他昆虫同源序列构建系统发育进化树。利用荧光定量 PCR 技术检测这两个基因在南亚实蝇不同发育阶段 (卵、1–3 龄幼虫、预蛹、蛹和刚羽化成虫) 的表达特性。【结果】克隆获得南亚实蝇鞣化激素基因 *bursicon-α* (GenBank 登录号: MH421861) 和 *bursicon-β* (GenBank 登录号: MH421862)。*bursicon-α* 基因开放阅读框为 551 bp, 编码 183 个氨基酸; *bursicon-β* 基因开放阅读框为 467 bp, 编码 156 个氨基酸。基于两个鞣化激素基因的氨基酸序列的系统发育树分析显示, 南亚实蝇 *Bursicon-α* 与 *Bursicon-β* 均与瓜实蝇 *Zeugodacus cucurbitae* 的同源蛋白亲缘关系最近, 且与其他双翅目昆虫的同源蛋白聚为一类, 形成独立的分支。荧光定量 PCR 结果表明, 两个基因在南亚实蝇各龄期均有表达, 均在第 5 天蛹和刚羽化成虫翅伸展时期表达量最高。【结论】*bursicon-α* 和 *bursicon-β* 基因在南亚实蝇不同发育阶段表达量不同, 推测其在南亚实蝇成虫表皮鞣化和翅的形成中发挥着重要作用。本研究为进一步探索鞣化激素在南亚实蝇生长过程中表皮的骨化、翅的重建等方面的功能机制奠定了基础。

关键词: 南亚实蝇; 鞣化激素; 表皮骨化; 基因表达; 翅伸展; 系统发育

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2018)10-1237-10

Molecular cloning and expression profiling of bursicon genes in the fruit fly *Zeugodacus tau* (Diptera: Tephritidae)

ZHANG He-He, ZHANG Qi-Wen, LIN Jia, JI Qing-E, CHEN Jia-Hua* (UN (China) Center for Fruit Fly Prevention and Treatment, State Key Laboratory of Ecological Pest Control for Fujian and Taiwan Crops, Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Institute of Beneficial Insects, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: 【Aim】To clone bursicon genes from the fruit fly *Zeugodacus tau* and to analyze their molecular characteristics and spatiotemporal expression patterns, so as to develop a basis for further study of their physiological functions. 【Methods】The complete cDNAs of *bursicon-α* and *bursicon-β* genes were cloned from the newly emerged adults of *Z. tau* by using homology-based cloning and RACE technology, and the phylogenetic trees were constructed with the homologous sequences of other insect species by using neighbor-joining method. The expression patterns of the two genes in different developmental stages (egg, 1st–3rd instar larva, prepupa, pupa and newly emerged adult) of *Z. tau* were detected by qPCR. 【Results】The full-length cDNAs of two bursicon genes *bursicon-α* (GenBank accession no. :

基金项目: 国家教育部博士点专项科研基金 (K41110003)

作者简介: 张贺贺, 男, 1988 年 12 月生, 山东济宁人, 博士研究生, 研究方向为昆虫生态与害虫综合治理, E-mail: zhh680216@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: jhchen34@163.com

收稿日期 Received: 2018-04-16; 接受日期 Accepted: 2018-06-20

MH421861) and *bursicon-β* (GenBank accession no. : MH421862) were cloned from *Z. tau*. *bursicon-α* contains a 551 bp open reading frame (ORF) encoding 183 amino acid residues, and *bursicon-β* has a 467 bp ORF encoding 156 amino acid residues. Phylogenetic tree analysis based on the amino acid sequences of the two *bursicon* genes showed that *Bursicon-α* and *Bursicon-β* of *Z. tau* had a closest genetic relationship with the homologous proteins of *Zeugodacus cucurbitae*, and clustered into one independent group with the homologous proteins of other dipterous insects. The qPCR results indicated that both *bursicon-α* and *bursicon-β* were expressed in all developmental stages of *Z. tau*, and highly expressed in 5 d-old pupae and in the wing expansion stage of the newly emerged adults. 【Conclusion】 The expression levels of *bursicon-α* and *bursicon-β* are different in different developmental stages of *Z. tau*, suggesting a crucial role of *bursicon* genes in cuticular tanning and wing formation. This study provides a foundation for further exploring the functional mechanisms of *bursicon* in cuticle sclerotization and wing reconstruction of *Z. tau*.

Key words: *Zeugodacus tau*; *bursicon*; cuticle sclerotization; gene expression; wing expansion; phylogeny

昆虫在生长发育过程中通常受到外骨骼的限制,所以必须周期性地蜕去坚硬的外表皮,不断分泌产生新表皮才能完成正常的生长发育(An *et al.*, 2012; 朱斌等, 2013)。新形成的表皮通常柔软且颜色较浅,免疫防御能力较弱,因此其表皮需要在短时间内迅速鞣化(黑化与硬化),以便保护虫体(Gorman and Arakane, 2010)。表皮的鞣化是伴随着蜕皮发生的,该过程会受到很多激素的协同调控,其中鞣化激素是调控表皮黑化和硬化所必需的(Davis *et al.*, 2007)。

鞣化激素最初是由 Fraenkel 和 Hsiao(1962)及 Cottrell (1962a, 1962b) 对刚羽化的红头丽蝇 *Calliphora erythrocephala* 颈部结扎时,发现其胸、腹部的表皮不能正常黑化,但被注入正常发育的红头丽蝇血淋巴后,表皮又恢复黑化的一种现象; Fraenkel 和 Hsiao(1965)推断血淋巴中存在一种能促进新羽化的丽蝇表皮鞣化的因子,并将这种因子命名为鞣化激素。由于当时条件和技术的诸多限制,在鞣化激素被发现的 40 多年间都没有大的进展,随着高通量测序技术的发展与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 基因组全序列的破译,发现鞣化激素不仅能引起新表皮的鞣化,还调控翅的伸展与重建,甚至在雌虾生殖方面尤其是在卵巢发育过程中卵黄蛋白原的合成方面也发挥着重要作用(Luo *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2007; Sathapondech *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2016)。

迄今为止,鞣化激素基因已经在昆虫纲包括双翅目、鳞翅目、直翅目、半翅目、鞘翅目和膜翅目等许多昆虫中发现,在甲壳纲及蛛形纲等动物中亦发现

了鞣化激素(Robertson *et al.*, 2007; Loy *et al.*, 2007; An *et al.*, 2008; Wilcockson and Webster, 2008; Richards *et al.*, 2008; Natzle *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010; Loveall and Deitcher, 2010; Andersen *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2010)。南亚实蝇 *Zeugodacus tau* (Walker), 亦称南亚寡鬃实蝇,俗称南瓜实蝇,是一种主要为害葫芦科植物、番茄及其他新鲜水果等 80 多种寄主植物的世界性检疫害虫(安坤鹏等, 2011)。该害虫首次在中国由 Walker 报道发生,在东亚及东南亚地区危害严重(White and Elson-Harris, 1992)。现每年给亚洲果农造成约 30% ~ 40% 的农产品经济损失(Jaleel *et al.*, 2018)。由于该害虫雌成虫在果实表皮或组织部位产卵,孵化的幼虫钻驻于果肉内取食引起腐烂或落果,严重影响果蔬商品质量与品质;另外,南亚实蝇寄主种类多,繁殖能力高,迁飞能力强,活动范围广,常规的防治方法效果甚微(Li *et al.*, 2017)。强大的迁飞能力是南亚实蝇迅速蔓延危害的主要原因之一,刚羽化成虫翅的正常伸展与振动严重影响着昆虫的飞行能力。在黑腹果蝇中,鞣化激素各个亚基基因的突变导致成虫羽化后翅不能正常伸展(Dewey *et al.*, 2004)。在家蚕 *Bombyx mori* 体内注射鞣化激素 BURS 亚基基因的 dsRNA,也会影响成虫羽化后翅的伸展(Huang *et al.*, 2007)。将鞣化激素各个亚基基因的 dsRNA 注射入赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 末龄幼虫,羽化后的成虫表皮的鞣化和翅的伸展均受到影响(Bai and Palli, 2010)。这些都表明鞣化激素能够调控昆虫翅的伸展过程。南亚实蝇作为迁飞能力较强的完全变态害虫,关于该害虫

鞣化激素的研究至今未见报道,鉴于鞣化激素在表皮鞣化和翅的伸展过程中的不可或缺的作用,本研究通过同源克隆及 RACE 技术克隆了南亚实蝇鞣化激素基因,分析其结构特征与功能,同时利用荧光定量技术研究了其在南亚实蝇不同发育阶段的表达模式,为后续研究 *Bursicon* 基因在南亚实蝇蜕皮后的鞣化、翅的伸展与重建等方面的功能机制奠定基础,同时对开拓生物防治新思路具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

南亚实蝇来自福建农林大学益虫研究所,已在室内饲养多代。饲养条件:室内温度(25 ± 2)℃,相对湿度 65% ± 5%,光周期 12L: 12D。

1.2 主要试剂

RN28 Easyspin Plus RNA Kit 购自艾德莱生物技术公司,HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 购自诺唯赞生物科技有限公司,SMART™ RACE 5′/3′Kit 和 pMD18-T vector 购自 TaKaRa 公司,2 × Taq PCR MasterMix, EasyPure PCR Purification Kit 和 TransStart Top Green qPCR SuperMix 购自全式金生物技术公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 RNA 提取及反转录

取 20 mg 刚羽化 20 min 的完整南亚实蝇雌雄

成虫于液氮环境下研磨,按照 RNA 抽提试剂盒说明书提取,分别使用试剂盒 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 与 SMART™ RACE 5′/3′Kit 反转成常规 cDNA 模板和 RACE cDNA 模板后于 - 20℃ 保存备用。

1.4 克隆南亚实蝇鞣化激素基因

根据双翅目昆虫同源序列比对找到一段相对保守的序列,设计克隆鞣化激素基因 *bursicon-α* 与 *bursicon-β* 中间片段的简并引物(表 1),以 1.3 节反转录获得的常规 cDNA 第 1 链为模板进行 PCR 扩增,反应体系(25 μL): 2 × Taq PCR MasterMix 12.5 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, cDNA 2.5 μL, ddH₂O 9 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min。分别获得 *bursicon-α* 与 *bursicon-β* 的中间片段,根据获得的对应中间片段分别设计 RACE 5′端和 3′端引物(表 1),将反转录获得的 cDNA 模板利用 SMART™ RACE 5′/3′Kit PCR 扩增获得基因末端序列。所有 PCR 产物均用 EasyPure PCR Purification Kit 进行 DNA 胶回收纯化,并克隆至 pMD18-T vector,转化到大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞,挑取 PCR 反应后的阳性克隆送伯尚生物工程有限公司(上海)测序,并用 ClustalX 和 NCBI 在线软件等比对、组装。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物 Primers	引物序列(5′-3′) Primer sequences	用途 Purpose
Ztburs-αF	TGTTACGCAAGTTCAGGC	中间片段扩增 Amplification of intermediate segments
Ztburs-αR	AATGGTGCTTTCGTCAGT	
Ztburs-βF	CGTTATTRCWCKTCCTCG	
Ztburs-βR	TBGGCTCACGCAGYCTTAT	
5′Ztburs-αR1	TGGGACAAAAGAGCGAAACGGCAGC	5′末端扩增 5′end amplification
5′Ztburs-αR2	GTTGCCCCGACTCCTGACAACACAT	
5′Ztburs-βR	GTGAGGAGAGGTGGGTGC	
3′Ztburs-αF	ACGACATCTCCACATTGGCGACG	3′末端扩增 3′end amplification
3′Ztburs-βF1	GGTGCTCCTCTTTGTGCTGAGTCGG	
3′Ztburs-βF2	TACGGGCGATGAGAACTGCCAAACG	
qZtburs-αF	TACCCAAGCCAATACCCTCG	qPCR 中目的基因扩增 Amplification of target genes in qPCR
qZtburs-αR	TTCGCCCTACTCCTGACAACA	
qZtburs-βF	GGCGATGAGAACTGCCAAAC	
qZtburs-βR	CGGACGGCTCCACTTGACTA	
Actin-F	ATCTGGCATCACACTTTCTAC	qPCR 中内参基因扩增 Amplification of the internal reference gene in qPCR
Actin-R	GTCATCTTCTCACGTTAGC	

1.5 生物信息学分析

比对验证后的全长序列利用在线软件 ORF Finder 获得 *bursicon-α* 与 *bursicon-β* 的开放阅读框 (ORF), 利用在线生物信息学软件 (DNAMAN 7.0, ClustalX, ExPASy, SignalP 4.1, NetNGLyc 1.0, NetPhos 2.0, TMHMM 和 MEGA 5.1 等) 分析鞣化激素基因的生物学信息并构建系统发育树。

1.6 鞣化激素基因的表达特征分析

分别取南亚实蝇不同发育时期(卵 200 粒, 1–3 龄幼虫分别为 5, 4 和 3 头, 化蛹 6, 16 和 22 h 的预蛹各 3 头, 2–7 天的蛹各 3 头, 刚羽化 10 min 与 30 min 的成虫各 3 头) 的样品, 用镊子小心将样本装入 RNase-free 的 1.5 mL EP 管内, 立即放入液氮并研磨, 按照 RN28 Easyspin Plus RNA Kit 抽提试剂盒说明书提取 RNA, 用试剂盒 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+ gDNA Wiper) 将 RNA 反转成定量 cDNA 模板。分别根据获得的全长 *bursicon-α* 与 *bursicon-β* 序列设计荧光定量表达引物(表 1), 以上述 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR, 按照试剂盒 TransStart Top Green qPCR SuperMix 说明书进行操作, 反应程序: 94℃ 预变性 30 s; 94℃ 5 s, 57℃ 15 s, 72℃ 10 s 共 40 个循环; 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达量, 每个样品设置 3 次生物学重复和 3 次技术性重复。表达量的显著性差异分析采用 SPSS 软件中的单因素方差分析 (ANOVA, Tukey 氏多重比较法, $P < 0.05$) 进行。

2 结果

2.1 南亚实蝇鞣化激素基因全长序列分析

利用常规 PCR 和 RACE 技术获得了南亚实蝇鞣化激素基因 *bursicon-α* (GenBank 登录号: MH421861) 与 *bursicon-β* (GenBank 登录号: MH421862) 的 cDNA 全长序列, 其中 *bursicon-α* 基因全长 868 bp, 包括 98 bp 的 5'-UTR, 551 bp 的开放阅读框 ORF, 及 219 bp 的 3'-UTR, 共编码 183 个氨基酸, 具有真核生物典型的加尾信号 (AATAAA) 和 poly A 结构(图 1: A)。*bursicon-β* 基因全长 674 bp, 包括 18 bp 的 5'-UTR, 467 bp 的开放阅读框 ORF, 及 189 bp 的 3'-UTR, 共编码 156 个氨基酸, 同样具有真核生物典型的加尾信号 (AATAAA) 和 poly A 结构(图 1: B)。

2.2 Bursicon 信号肽预测及分析

利用 SignalP 4.0 在线软件对南亚实蝇 *bursicon-*

α 和 *bursicon-β* 基因对应的氨基酸序列进行潜在信号肽裂解位点预测, *bursicon-α* 基因对应的氨基酸序列并未发现信号肽, *bursicon-β* 基因对应氨基酸序列具有信号肽(图 2), 预测的信号肽由 34 个氨基酸组成, 为 MSTRYCTSSSIYGLLSWLLVLLFVLSRLERRVSA, 因此进行原核表达时, 一般要将该信号肽去除。

2.3 Bursicon 理化性质预测及分析

采用 NetNGLyc 1.0 在线软件对鞣化激素序列糖基化位点进行分析, 南亚实蝇 *Bursicon-α* 与 *Bursicon-β* 均未发现糖基化位点。采用 NetPhos 2.0 在线软件分析其磷酸化位点, 发现 *Bursicon-α* 存在 14 个丝氨酸、2 个苏氨酸和 2 个酪氨酸; *Bursicon-β* 存在 12 个丝氨酸、8 个苏氨酸和 1 个酪氨酸。通过 ExPASy 在线软件分析, *Bursicon-α* 理论相对分子量为 20.36 kD, 等电点为 8.61, 为亲水性蛋白, 且具有明显的跨膜结构域; *Bursicon-β* 理论相对分子量为 17.71 kD, 等电点为 6.14, 为亲水性蛋白, 亦具有明显的跨膜结构域。

2.4 Bursicon 蛋白二级结构预测

采用 NPS@-SOPM 在线软件预测到南亚实蝇 *Bursicon-α* 蛋白的二级结构主要有 α -螺旋结构、延伸链结构与无规则卷曲结构。3 种主要结构所占比例由大到小依次为无规则卷曲区域 71 个氨基酸占 38.80%, α -螺旋区域 56 个氨基酸占 30.60%, 延伸链区域 40 个氨基酸占 21.86%。南亚实蝇 *Bursicon-β* 蛋白的二级结构主要有 α -螺旋结构、延伸链结构与无规则卷曲结构。3 种主要结构所占比例由大到小依次为 α -螺旋区域 77 个氨基酸占 49.68%, 无规则卷曲区域 50 个氨基酸占 32.26%, 延伸链区域 16 个氨基酸占 10.32%。

2.5 氨基酸序列比对及系统发育树的构建

将南亚实蝇 *bursicon-α* 和 *bursicon-β* 基因对应的氨基酸序列分别与所选物种进行同源性比对, 并使用 MEGA 5.0 软件, 采用 NJ 法 (bootstrap, 1 000) 构建进化树, 分析其物种近缘进化关系, 分析表明: 与南亚实蝇 *Bursicon-α* 和 *Bursicon-β* 同源性最高的是瓜实蝇 *Zeugodacus cucurbitae* 的 *Bursicon-α* 和 *Bursicon-β* (氨基酸序列一致性分别为 99% 和 99%), 然后依次为辣椒实蝇 *Bactrocera latifrons* 的 *Bursicon-α* 和 *Bursicon-β* (氨基酸序列一致性分别为 94% 和 99%), 橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 的 *Bursicon-α* 和 *Bursicon-β* (氨基酸序列一致性分别为 94% 和 98%), 油橄榄实蝇 *Bactrocera oleae* 的 *Bursicon-α* 和 *Bursicon-β* (氨基酸序列一致性分别为 92% 和 97%)。南亚实蝇

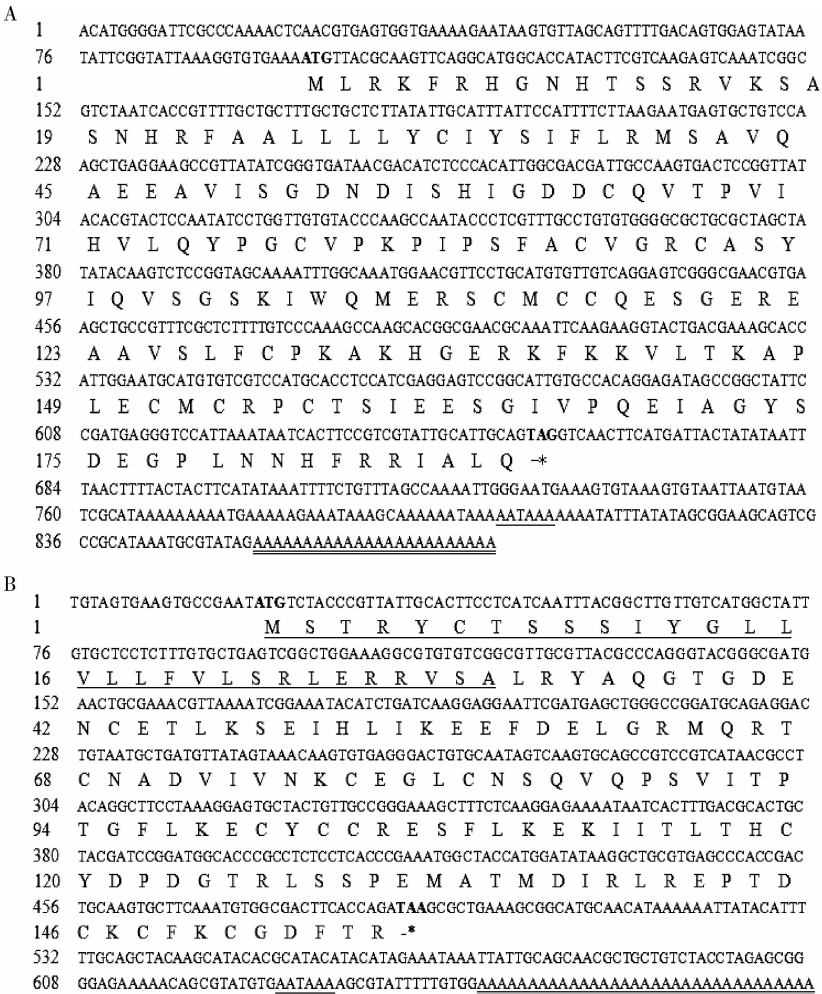


图1 南亚实蝇 *bursicon-α* (A)和 *bursicon-β* (B) 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *bursicon-α* (A) and *bursicon-β* (B) in *Zeugodacus tau*

起始密码子与终止密码子黑色加粗标识,加尾信号 (AATAAA) 与信号肽用黑色下划线标出, polyA 结构用双下划线标出。The start and stop codons are in black bold; the polyadenylation signal sequence (AATAAA) and signal peptide are shown by the black underline; the polyA tail structure is shown by double black underline.

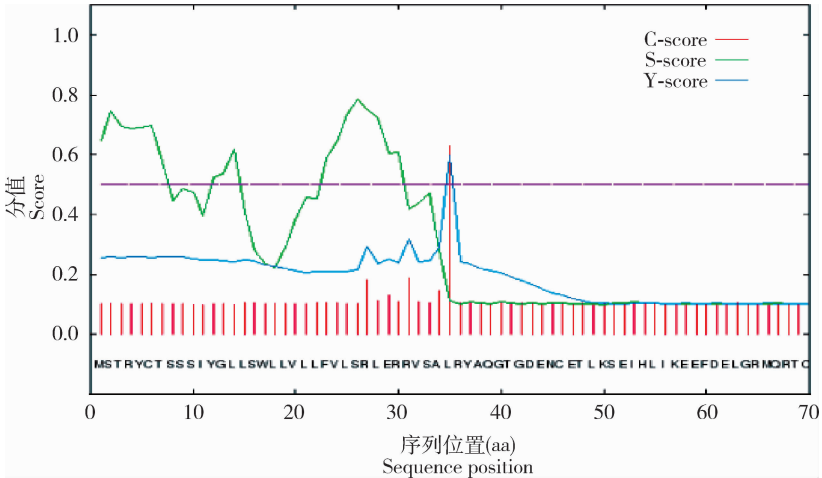


图2 Bursicon-β 信号肽预测

Fig. 2 Signal peptide analysis of Bursicon-β

C-score: 原始剪切位点分值 Original splicing site score; S-score: 信号肽分值 Signal peptide score; Y-score: 被剪切位点分值 Spliced site score.

A

Zebursicon-α	...MLRKFRNGH.ITSSRKYSANNNRFAALLLLYCIYSIFLR...MSAVQAREAVIS.GDNDSHIG...DDQQTVEIVHVLYQPGCVFKFIFSPACVGR	89
Zebursicon-α	...MMMLKKFRNGH.ITSSRKYSANNNRFAALLLLYCIYSIFLR...MSAVQAREAVIS.GDNDSHIG...DDQQTVEIVHVLYQPGCVFKFIFSPACVGR	91
Bdbursicon-α	...MLRKFRNGH.ITSSRKYSANNNRFAALLLLYCIYSIFLR...MSAAQAREGVIT.GDNDSHIG...DDQQTVEIVHVLYQPGCVFKFIFSPACVGR	89
Bdbursicon-α	...MLRKFRNGH.ITSSRKYSANNNRFAALLLLYCIYSIFLR...MSAAQAREGVIT.GDNDSHIG...DDQQTVEIVHVLYQPGCVFKFIFSPACVGR	91
Cdbursicon-α	...MMMLKKFRNGH.HSSRTKSAFNNHLSVLLLLYCVYFIFLR...MSAAQAREGVIT.ADDNDISHIG...DDQQTVEIVHVLYQPGCVFKFIFSPACVGR	93
Cdbursicon-α	MVMKMLRLKRTNGSISLRACSKNNRRFVALVLCYCIYFVIFR...LSAQAREAITA.VNDVSHIG...DDQQTVEIVHVLYQPGCVFKFIFSPACVGR	93
Dmbursicon-α	...MLRLILRHE.....NNKRVFVILLVYCVLSLTK...LCTAQDSQVAA.TNDNDITHLS...DDQQTVEIVHVLYQPGCVFKFIFSPACVGR	79
Dmbursicon-α	...MSAAVFRNGH.....NQRLRFSTLSGMLLMLITCYTIFPLR...MSAAQAREGVIT.TNDNDISHIG...DDQQTVEIVHVLYQPGCVFKFIFSPACVGR	82
Dmbursicon-α	...MSVINTP.LVIALVT...LCYVNDPEVVTGH...EVQLPBGTKFQCQEQMTAVHVLKHSRCKFKALISFACIGK	66
Slbursicon-α	...MFRFDIISLSLVLS...AVQNNDRFVRQAQSEVQLPFG...EQCQMTVEIVHLKHPGCTFKALISFACIGK	66
Prbursicon-α	...MPSFHYIFTCGLVLS...ACYLQDKFVRSQ...EVQLPFG...EQCQMTVEIVHVLYQPGCVFKFIFSPACVGR	64
Tdbursicon-α	...MTFFSTFVPLR...KELIDPRLN.SK.IQVGSASTT...DEQQTVEIVHVLYQPGCVFKFIFSPACVGR	65
Tdbursicon-α	...MLRQ.....LDIVFQRLNQITTFIILG...NMCMDFRLSRGT.LEVSGTSTT...DEQQTVEIVHVLYQPGCVFKFIFSPACVGR	75
Ldbursicon-α	...MFSR.....BCVYVIRSLWYVITFIILG...NMCMDFRLSAT.SQVGAASTT...DEQQTVEIVHVLYQPGCVFKFIFSPACVGR	75
Ndbursicon-α	...MTHG.....LTFKVFHMRKRELVLVILG...NMCMDFRFGQ.GK.TLVQAAMAA...DEQQTVEIVHVLYQPGCVFKFIFSPACVGR	74
Ambursicon-α	...MLTHVIG.....MLTHVIG...ETAKAALIGV...DEQCATVEIVHFLYQPGCVFKFIFSPACVGR	56
Bibursicon-α	...MLLTHVIG.....ASVLICLLS...ETAKAALIGV...DEQCATVEIVHFLYQPGCVFKFIFSPACVGR	56
Acbursicon-α	...MFNSITYYVG...ASVLICLLS...ETAKAALIGV...DEQCATVEIVHFLYQPGCVFKFIFSPACVGR	60
Dnbursicon-α	...TCYAAV...VOLLICLLS...GSTRATVGV...DEQCATVEIVHFLYQPGCVFKFIFSPACVGR	53
Consensus	sq e v h l g c p k i p a a e g	

Zebursicon-α	CASYIQVSGSKIWQMRSCMCCQSGSGERAAVSLFCFKAKHGKRFKKVLTAKPLECMCRFCTSIEESGIVFQEIQ.YSDEQGLNN..HFRFIALQ....	182
Zebursicon-α	CASYIQVSGSKIWQMRSCMCCQSGSGERAAVSLFCFKAKHGKRFKKVLTAKPLECMCRFCTSIEESGIVFQEIQ.YSDEQGLNN..HFRFIALQ....	185
Bdbursicon-α	CASYIQVSGSKIWQMRSCMCCQSGSGERAAVSLFCFKAKHGKRFKKVLTAKPLECMCRFCTSIEESGIVFQEIQ.YSDEQGLNN..HFRFIALQHWNH	187
Bdbursicon-α	CASYIQVSGSKIWQMRSCMCCQSGSGERAAVSLFCFKAKHGKRFKKVLTAKPLECMCRFCTSIEESGIVFQEIQ.YSDEQGLNN..HFRFIALQHWNH	185
Cdbursicon-α	CASYIQVSGSKIWQMRSCMCCQSGSGERAAVSLFCFKAKHGKRFKKVLTAKPLECMCRFCTSIEESGIVFQEIQ.YSDEQGLNN..HFRFIALQ....	187
Dmbursicon-α	CASYIQVSGSKIWQMRSCMCCQSGSGERAAVSLFCFKAKHGKRFKKVLTAKPLECMCRFCTSIEESGIVFQEIQ.YSDEQGLNN..HFRFIALQ....	173
Dmbursicon-α	CASYIQVSGSKIWQMRSCMCCQSGSGERAAVSLFCFKAKHGKRFKKVLTAKPLECMCRFCTSIEESGIVFQEIQ.YSDEQGLNN..HFRFIALQ....	176
Btbursicon-α	CTSYVQVSGSKIWQMRSCMCCQSGSGERATVVLFCFKAKSGDEKFRKRVSTAKPLECMCRFCTSIEESGIVFQEIQ.YSDEQGLNN..HFRFIALQ....	150
Slbursicon-α	CTSYVQVSGSKIWQMRSCMCCQSGSGERATVVLFCFKAKSGDEKFRKRVSTAKPLECMCRFCTSIEESGIVFQEIQ.YSDEQGLNN..HFRFIALQ....	150
Tdbursicon-α	CTSYVQVSGSKIWQMRSCMCCQSGSGERATVVLFCFKAKSGDEKFRKRVSTAKPLECMCRFCTSIEESGIVFQEIQ.YSDEQGLNN..HFRFIALQ....	143
Ldbursicon-α	CTSYVQVSGSKIWQMRSCMCCQSGSGERATVVLFCFKAKSGDEKFRKRVSTAKPLECMCRFCTSIEESGIVFQEIQ.YSDEQGLNN..HFRFIALQ....	169
Ndbursicon-α	CASYIQVSGSKIWQMRSCMCCQSGSGERAAVSLFCFKAKHGKRFKKVLTAKPLECMCRFCTSIEESGIVFQEIQ.YSDEQGLNN..HFRFIALQ....	169
Ambursicon-α	CASYIQVSGSKIWQMRSCMCCQSGSGERAAVSLFCFKAKHGKRFKKVLTAKPLECMCRFCTSIEESGIVFQEIQ.YSDEQGLNN..HFRFIALQ....	168
Cbursicon-α	CASYIQVSGSKIWQMRSCMCCQSGSGERAAVSLFCFKAKHGKRFKKVLTAKPLECMCRFCTSIEESGIVFQEIQ.YSDEQGLNN..HFRFIALQ....	157
Cbursicon-α	CASYIQVSGSKIWQMRSCMCCQSGSGERAAVSLFCFKAKHGKRFKKVLTAKPLECMCRFCTSIEESGIVFQEIQ.YSDEQGLNN..HFRFIALQ....	153
Dnbursicon-α	CASYIQVSGSKIWQMRSCMCCQSGSGERAAVSLFCFKAKHGKRFKKVLTAKPLECMCRFCTSIEESGIVFQEIQ.YSDEQGLNN..HFRFIALQ....	150
Consensus	c a y q v s g s k i w m r s c m c c q s g s g e r a a v s l f c f k a k h g k r f k k v l t a k p l e c m c r f c t s i e e s g i v f q e i q	

B

Zebursicon-β	MSTRYCTSSSIYGLLS..WLLVLLFVLSRLERRVSALRYAQGTG.DENCETLKSEIHILKEEPDELGRMQRTCNADVNN	77
Bdbursicon-β	MSTRYCTSSSIYGLLS..WLLVLLFVLSRLERRVSALRYAQGTG.DENCETLKSEIHILKEEPDELGRMQRTCNADVNN	77
Bdbursicon-β	MSTRYCTSSSIYGLLS..WLLVLLFVLSRLERRVAALRYAQGTG.DENCETLKSEIHILKEEPDELGRMQRTCNADVNN	77
Zdbursicon-β	MSTRYCTSSSIYGLLS..WLLVLLFVLSRLERRVSALRYAQGTG.DENCETLKSEIHILKEEPDELGRMQRTCNADVNN	77
Cdbursicon-β	MTSRYCTSTTTCAHFLRLALAVLLTSSLEGHVSALRYAQGTG.DENCETLKSEIHILKEEPDELGRMQRTCNADVNN	79
Bdbursicon-β	MSIRYCTSSSIYGLLS..WLLVLLFVLSRLERKHAALRYAQGTG.DENCETLKSEIHILKEEPDELGRMQRTCNADVNN	77
Mdbursicon-β	MLKMKWLS..LQCLFIYLLFVPLELTHALRYSGQTG.DENCETLKSEIHILKEEPDELGRMQRTCNADVNN	69
Dmbursicon-β	MH..VQELLFVAAILVFPQLRALRYSGQTG.DENCETLKSEIHILKEEPDELGRMQRTCNADVNN	63
Tdbursicon-β	MFDKIILCLVYATCVYSVSEIS.ETCETLMSDINILKEEPDELGRMQRTCNADVNN	58
Ldbursicon-β	MLFYTVFPGAMAVSFVYCLNDMS.ETCETLPSHILHTEKEEPDELGRMQRTCNADVNN	57
Ndbursicon-β	MGAIARLFFCCFILNLVYITVNSLNEIFGRENCELTFSIDINILKEEPDELGRMQRTCNADVNN	61
Atbursicon-β	MAITVFRHIVFACMMPYVYCCVSDLA.ETCETIPSDHLHTEKEEPDELGRMQRTCNADVNN	61
Pdbursicon-β	MAVYKTLFELLLEV.LIITMKCCADENCELTFSHIVHTEKEEPDMDGRLLRSCSGEVN	59
Btbursicon-β	NMIMTIKIFFLVQL.FYIVVSKSSAENCETVASEVHVHTEKEEPDMDGRLLRSCSGEVN	59
Pdbursicon-β	MSVTSKFYILFTVHFLFMIWLESSARESCETIPTEHILHTEKEEPDMDGRLLRSCSGEVN	60
Slbursicon-β	MSTVTSKILFIYIGLQLCLVLQCAAEACETIPTEHILHTEKEEPDMDGRLLRSCSGEVN	60
Bibursicon-β	MFIPALFVVLTAFIYNNDTVAQVTDNCELTQSEVHITKDEYDRIGRKRTCSGDIPT	60
Acbursicon-β	MKMFNIMFIYISIFLILIIFIYTNETVAQVTDNCELTQSEVHITKDEYDRIGRKRTCSGDIPT	67
Antbursicon-β	MKMFNIMFIYISIFLILIIFIYTNETVAQVTDNCELTQSEVHITKDEYDRIGRKRTCSGDIPT	67
Dnbursicon-β	MFLISTVLSSIFIFISSTMSQIIDDSECELTQSEVHITKDEYDRIGRKRTCSGDIPT	60
Consensus	e c e t k d g c e v	

Zebursicon-β	KCEGLCNQVQPSVITPTGFLKECYCCRESFLKEKIIILTHCYDPDGTRLSSFEMATMDIRLEPTDCKCFKCGDFT	154
Bdbursicon-β	KCEGLCNQVQPSVITPTGFLKECYCCRESFLKEKIIILTHCYDPDGTRLSSFEMATMDIRLEPTDCKCFKCGDFT	154
Bdbursicon-β	KCEGLCNQVQPSVITPTGFLKECYCCRESFLKEKIIILTHCYDPDGTRLSSFEMATMDIRLEPTDCKCFKCGDFT	154
Zdbursicon-β	KCEGLCNQVQPSVITPTGFLKECYCCRESFLKEKIIILTHCYDPDGTRLSSFEMATMDIRLEPTDCKCFKCGDFT	154
Cdbursicon-β	KCEGLCNQVQPSVITPTGFLKECYCCRESFLKEKIIILTHCYDPDGTRLSSFEMATMDIRLEPTDCKCFKCGDFT	156
Bdbursicon-β	KCEGLCNQVQPSVITPTGFLKECYCCRESFLKEKIIILTHCYDPDGTRLSSFEMATMDIRLEPTDCKCFKCGDFT	154
Mdbursicon-β	KCEGLCNQVQPSVITPTGFLKECYCCRESFLKEKIIILTHCYDPDGTRLSSFEMATMDIRLEPTDCKCFKCGDFT	146
Dmbursicon-β	KCEGLCNQVQPSVITPTGFLKECYCCRESFLKEKIIILTHCYDPDGTRLSSFEMATMDIRLEPTDCKCFKCGDFT	140
Tdbursicon-β	KCEGSCKQVQPSVITPTGFLKECYCCRESFLRERITILTHCYDPDGVRLTAETVNSMDVKLREPAECCKYKCGDFT	134
Ldbursicon-β	KCEGSCKQVQPSVITPTGFLKECYCCRESFLRERITILTHCYDPDGVRLTGEQNDAMIDILREPAECCKYKCGDFT	138
Ndbursicon-β	KCEGTCNKQVQPSVITPTGFLKECYCCRESYLRRERITILTHCYDPDGIIRLGEQGTMDIKLREPAECCKYKCGDFT	140
Ambursicon-β	KCEGSCKQVQPSVITPTGFLKECYCCRESYLRRERITILTHCYDPDGVRLTGEHNNAMIDILREPAECCKYKCGDFT	138
Pdbursicon-β	KCEGINCNQVQPSVITPTGFLKECFCKENYLRERLVLTHCYAPDGLRLEDEERALMEIRLREPAECCKYKCGDFT	136
Cbursicon-β	KCEGMNCQVHPSISSTPGQKECFCKERFLRERLVLTHCYDPDGIIRFEDENALMEIRLREPAECCKYKCGDFT	136
Pdbursicon-β	KCEGMNCQVQPSVVVPTGFLKECFCKENYLRERLVLTHCYDPDGIIRLEDEERFAMHREIRLREPAECCKYKCGDFT	137
Slbursicon-β	KCEMGCSQVVRPSISAGTGFSGKDCFCCKENYLRERLVLTHCYDPDGVRLDEED.SIRHVRLEPDCKYKCGDFT	136
Bdbursicon-β	KCEGFCSSQVQPSVASTTGFSGKECYCCRESYLKERNHILHHCYDADGILKMHNEEDGVHETKIREPAECCKTKCGDTS	137
Acbursicon-β	KCEGFCNKQVQPSVASTTGFSGKECYCCRESYLKERNHILHHCYDADGILKMHNEENGINHETKIREPCKCTKCGDTS	144
Antbursicon-β	KCEGFCNKQVQPSVASTTGFSGKECYCCRESYLKERNHILHHCYDADGILKMHNEENGVHETKIREPCKCTKCGDTS	144
Dnbursicon-β	KCEGFCSSQVQPSVASTTGFSGKECYCCRESYLKERNHILHHCYDADGILKLLNEEDKINIREPAECCKTKCGDVE	137
Consensus	k e e g c s q v p s i s s t g f k c c e e e l e l h c y d g m e p c k k e g	

图3 南亚实蝇与其他昆虫 Bursicon-α (A) 和 Bursicon-β (B) 氨基酸序列多重比对

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of Bursicon-α (A) and Bursicon-β (B) from *Zeugodacus tau* and other insect species

Bursicon-α 和 Bursicon-β 来源及 GenBank 登录号 Origin species of Bursicon-α and bursicon-β and their GenBank accession numbers: Zebursicon-α, Zebursicon-β: 瓜实蝇 *Zeugodacus cucurbitae* (XP_011189704.1, XP_011182872.1); Zibursicon-α, Zibursicon-β: 南亚实蝇 *Zeugodacus tau* (MH421861, MH421862); Blbursicon-α, Blbursicon-β: 辣椒实蝇 *Bactrocera latifrons* (XP_018799687.1, XP_018791514.1); Bdbursicon-α, Bdbursicon-β: 橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (XP_011213470.1, XP_011213771.1); Bbursicon-α, Bbursicon-β: 油橄榄实蝇 *Bactrocera oleae* (XP_014098421.1, XP_014100764.1); Cebursicon-α, Cebursicon-β: 地中海实蝇 *Ceratitis capitata* (XP_004523233.1, XP_004530937.1); Dmbursicon-α, Dmbursicon-β: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP_650983.1, NP_609712.1); Mdbursicon-α, Mdbursicon-β: 家蝇 *Musca domestica* (XP_005179453.1, XP_005188000.1); Bmbursicon-α, Bmbursicon-β: 家蚕 *Bombyx mori* (NP_001091845.1, NP_001037289.1); Slbursicon-α, Slbursicon-β: 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (XP_022828186.1, XP_022828187.1); Prbursicon-α, Prbursicon-β: 菜青虫 *Pieris rapae* (XP_022122107.1, XP_022122108.1); Pxbursicon-α, Pxbursicon-β: 小菜蛾 *Plutella xylostella* (AJM76770.1, AJM76771.1); Tcbursicon-α, Tcbursicon-β: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (ABA40402.1, NP_001107780.1); Atbursicon-α, Atbursicon-β: 小蜂窝甲虫 *Aethina tumida* (XP_019870760.1, XP_019870738.1); Ldbursicon-α, Ldbursicon-β: 马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (XP_023014168.1, XP_023014169.1); Nvbursicon-α, Nvbursicon-β: 大红葬甲 *Nicrophorus vespilloides* (XP_017771075.1, XP_017771076.1); Ambursicon-α, Ambursicon-β: 西方蜜蜂 *Apis mellifera* (NP_001091704.1, NP_001035352.2); Bibursicon-α, Bibursicon-β: 熊蜂 *Bombus impatiens* (XP_003485714.1, XP_012249588.1); Acbursicon-α, Acbursicon-β: 东方蜜蜂 *Apis cerana* (XP_016915076.1, XP_016915144.1); Dnbursicon-α, Dnbursicon-β: 杜隧蜂 *Dufourea novaeangliae* (KZC03908.1, KZC03907.1). 保守的 11 个半胱氨酸残基为二硫键结合位点, 用下标 C 标识, 其余保守氨基酸残基用对应字母标识并用不同的阴影表示。The conserved 11 cysteines are binding sites for disulfide bond marked with subscript C, and the rest of conserved amino acid residues are shown in shade with corresponding letters.

Bursicon- α 与 Bursicon- β 均含有鞣化激素保守的 11 个半胱氨酸残基,并用 C 标出,其余保守序列用不同阴影及字母标识(图 3)。系统发育树显示,南亚实蝇 Bursicon- α 与 Bursicon- β 均与瓜实蝇的同源蛋

白亲缘关系最近,且与其他双翅目昆虫的同源蛋白形成独立的分支,聚为一类;且所选物种对应的膜翅目、鳞翅目与鞘翅目等昆虫分别形成独立的分支(图 4),均与南亚实蝇亲缘关系较远。

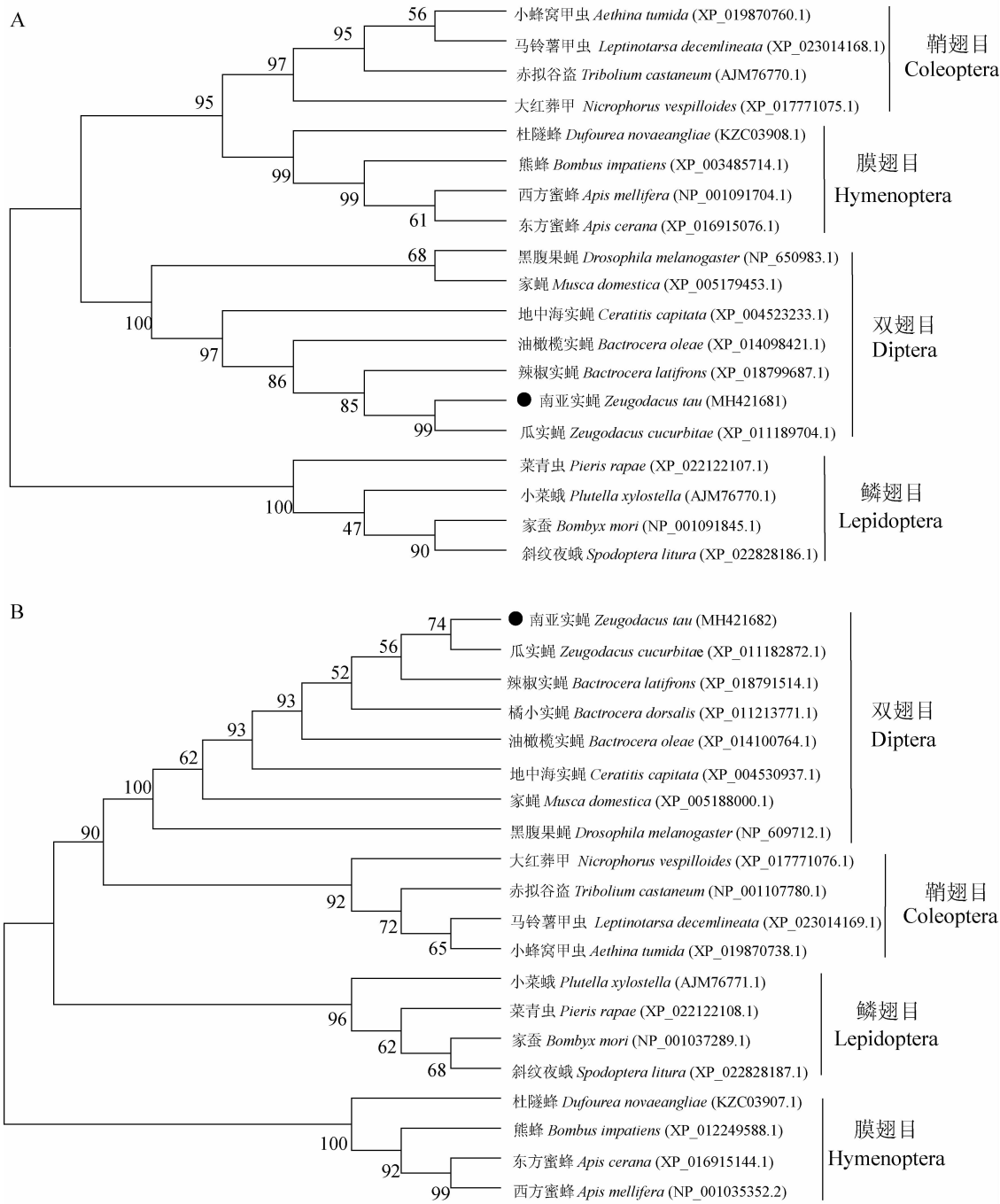


图 4 南亚实蝇与其他昆虫基于 Bursicon- α (A) 和 Bursicon- β (B) 氨基酸序列的系统进化树 (邻接法, 自举检验重复 1 000 次)

Fig. 4 Phylogenetic trees based on amino acid sequences of Bursicon- α (A) and Bursicon- β (B) from *Zeugodacus tau* and other insect species (neighbor-joining method, 1 000 bootstrap replicates)

2.6 Bursicon 基因在南亚实蝇不同发育阶段的表达模式分析

实时荧光定量 PCR 结果显示: *bursicon-α* 与 *bursicon-β* 基因在南亚实蝇发育期不同阶段均有表达,且表达量高低不同,但均在 5 日龄蛹与刚羽化成虫翅伸展时期表达量最高(图 5),这表明鞣化激素

在昆虫表皮骨化和翅重建等方面发挥着重要作用。除此之外,鞣化激素尤其是 *bursicon-α* 基因在卵-1 龄幼虫时期亦有相当程度的表达,推测这可能与鞣化激素能刺激卵黄蛋白原的合成,促进向幼虫的安全过渡有密切联系。

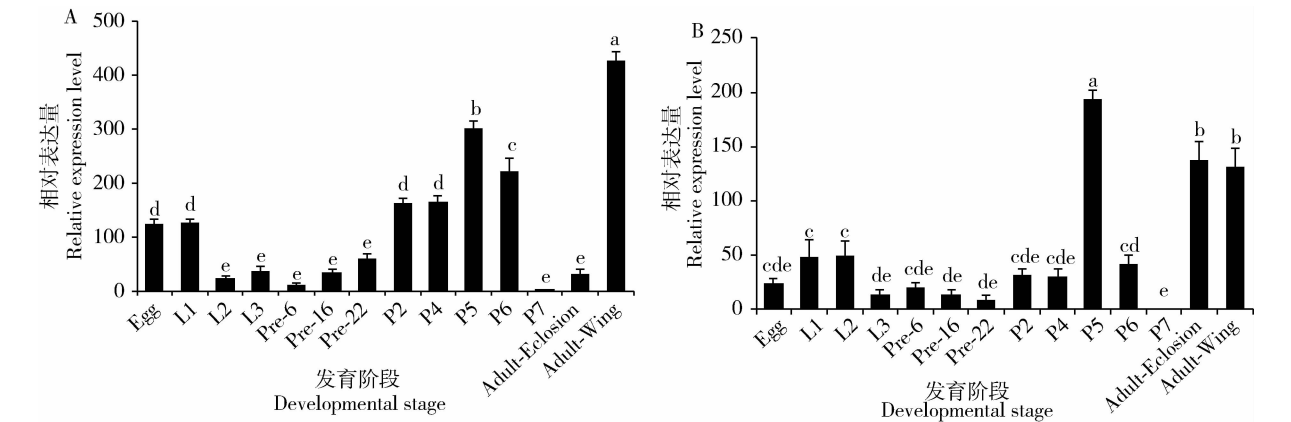


图 5 *bursicon-α* (A) 和 *bursicon-β* (B) 在南亚实蝇不同发育阶段的表达

Fig. 5 Relative expression levels of *bursicon-α* (A) and *bursicon-β* (B) in different developmental stages of *Zeugodacus tau*. Egg: 卵; L1-3: 分别为 1-3 龄幼虫 1st-3rd instar larva, respectively; Pre-6, Pre-16, Pre-22: 分别为化蛹后 6, 16 和 22 h 的预蛹 6, 16 and 22 h-old prepupa, respectively; P2-7: 分别为化蛹后第 2-7 天的蛹 2-7 d-old pupa, respectively; Adult-Ecdysis: 刚羽化的成虫 Newly emerged adult; Adult-Wing: 刚羽化成虫翅伸展时期 Wing expansion stage of the newly emerged adult. 柱上不同字母代表基因表达量差异显著 ($P < 0.05$, Tukey 氏多重比较法; $n = 3$). Different letters on the bars of the histogram indicate statistically significant difference in gene expression level ($P < 0.05$, Tukey's multiple range test; $n = 3$).

3 讨论

鞣化激素是调节昆虫表皮黑化和硬化以及翅发育的一种神经肽激素,随着研究的不断深入,其越来越多的功能被挖掘出来,在对雌虾生殖方面及对昆虫免疫系统调节方面亦发挥重要作用;尽管目前对鞣化激素的研究主要集中在刚羽化成虫体壁鞣化与翅的重建伸展方面,且在多种昆虫上都有不同程度的研究,但未见对南亚实蝇鞣化激素基因研究的报道。本研究根据同源克隆的方法,利用 RACE 技术首次获得南亚实蝇鞣化激素两个亚基基因 *bursicon-α* 与 *bursicon-β* 的全长序列,对其氨基酸序列分析发现,南亚实蝇 *Bursicon-α* 和 *Bursicon-β* 与双翅目昆虫瓜实蝇 *Zeugodacus cucurbitae* *Bursicon-α* 和 *Bursicon-β*、橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* *Bursicon-α* 和 *Bursicon-β*、辣椒实蝇 *Bactrocera latifrons* *Bursicon-α* 和 *Bursicon-β*、油橄榄实蝇 *Bactrocera oleae* *Bursicon-α* 和 *Bursicon-β* 均具有较高的同源性,且均含有保守的半胱氨酸残基,其他氨基酸序列也极

其保守,说明鞣化激素在双翅目昆虫之间不仅保守,其生物活性对昆虫正常生长发育具有不可替代的作用。系统进化树分析表明南亚实蝇 *Bursicon-α* 与 *Bursicon-β* 与其他双翅目昆虫的同源蛋白聚为一类,与瓜实蝇的同源蛋白亲缘关系最近。

荧光定量表达分析表明,鞣化激素基因 *bursicon-α* 与 *bursicon-β* 在南亚实蝇发育的各个阶段均有不同程度的表达,这与其他研究结果 (Huang *et al.*, 2007; An *et al.*, 2010) 相似。*bursicon-α* 与 *bursicon-β* 基因在刚羽化成虫翅伸展时表达量较高,这与禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* 和桃蚜 *Myzus persicae* 中的表达结果相似 (刘孝明等, 2015; 张超等, 2017),推测这可能与鞣化激素参与调控新羽化成虫翅的伸展及新形成表皮的骨化有关。刚羽化成虫表皮柔软且颜色浅淡,此时成虫免疫力低下,表皮需要迅速硬化和黑化以增强抵抗力来保护虫体;同时翅处于伸展舒张期,亦需要短时间内快速充血骨化以震动飞翔,来补充营养与水分。5 日龄蛹中表达量最高,此时处于蛹内成虫形体构建与转化的关键时期,需要能量和黑色素等的沉积为成虫的羽化

做准备,这与黑腹果蝇、家蝇 *Musca domestica*、小菜蛾 *Plutella xylostella* 和家蚕等研究结果相似 (Dewey *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010; 马小丽等, 2013)。除此之外,鞣化激素基因尤其是 *bursicon-α* 基因在卵和 1 龄幼虫时期亦有相当程度的表达,这与桃蚜、禾谷缢管蚜中表达结果 (刘孝明等, 2015; 张超等, 2017) 相似,推测这可能与鞣化激素能刺激卵黄蛋白原的合成,提高向幼虫过渡时的免疫防御力有密切联系,在黑腹果蝇中 An 等鉴定出鞣化激素可以调控其免疫相关基因的表达 (An *et al.*, 2012);在对蓝蟹 *Callinectes sapidus* 的研究中发现鞣化激素可以诱导血细胞的造粒功能 (Chung *et al.*, 2012),在斑节对虾 *Penaeus monodon* 中发现鞣化激素能刺激卵黄蛋白原的表达 (Sathapondecha *et al.*, 2015),这说明鞣化激素在卵、1 龄幼虫期间有相当程度的表达对其生长发育发挥着重要作用。以上分析说明,虽然鞣化激素在昆虫之间比较保守,但在不同昆虫种类中的表达模式呈现不同程度的差异,且其越来越多的功能被不断发现,意味着鞣化激素可能在昆虫发育过程中还参与其他未被发现的相关功能,等待着科研工作者去发现。本研究表明鞣化激素基因在刚羽化成虫及翅伸展时有表达量上的积极响应,该基因的功能尤其是鞣化激素两个亚基基因之间,是其中一个亚基起主导作用,还是协调联合作用都需要采用 RNAi 的方式进一步研究与探索。对于大多数的昆虫害虫而言,其飞行能力对于其生存都至关重要,对鞣化激素在其刚羽化时翅的伸展中作用的研究可以为害虫防治开拓新思路,且昆虫的蜕皮与鞣化需要一系列激素及基因的协同作用才能完成,作为该通路中的重要基因,本研究结果无论是从对鞣化激素功能机制研究方面还是对南亚实蝇的生物防治方面都具有重要意义。

参考文献 (References)

- An KP, Wu BF, Shen K, Zhang RJ, 2011. Characteristic and research progress on control technology of pumpkin fruit fly *Bactrocera tau* (Walker) (Diptera: Tephritidae). *J. Changjiang Veget.*, (20): 7–13. [安坤鹏, 吴保锋, 申科, 张润杰, 2011. 南瓜实蝇特性及防治技术的研究进展. 长江蔬菜, (20): 7–13]
- An S, Wang S, Stanley D, Song QS, 2010. Identification of a novel bursicon-regulated transcriptional regulator, md13379, in the house fly *Musca domestica*. *Arch. Insect Biochem.*, 70(2): 106–121.
- An SH, Dong SZ, Wang Q, Li S, Gibert LI, Stanley D, Song QS, 2012. Insect neuropeptide bursicon homodimers induce innate immune and stress genes during molting by activating the NF-κB transcription factor relish. *PLoS ONE*, 7(3): e34510.
- An SH, Wang SJ, Gilbert LI, Beerntsen B, Ellersieck M, Song Q, 2008. Global identification of bursicon-regulated genes in *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics*, 9(1): 424–424.
- Andersen SO, Willis JH, Muthukrishnan S, 2010. Insect cuticular sclerotization: a review. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 40(3): 166–178.
- Bai H, Palli SR, 2010. Functional characterization of bursicon receptor and genome-wide analysis for identification of genes affected by bursicon receptor RNAi. *Dev. Biol.*, 344(1): 248–258.
- Chung JS, Katayama H, Dirksen H, 2012. New functions of arthropod bursicon: inducing deposition and thickening of new cuticle and hemocyte granulation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *PLoS ONE*, 7(9): e46299.
- Costa CP, Ella-Neto M, Falcon T, Dallacqua RP, Martins JR, Gentile-Bitondi MMG, 2016. RNAi-mediated functional analysis of bursicon genes related to adult cuticle formation and tanning in the honeybee, *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, 11(12): e0167421.
- Cottrell CB, 1962a. The imaginal ecdysis of blowflies. Detection of the blood-borne darkening factor and determination of some of its properties. *Bioorgan. Med. Chem.*, 39(1): 67–73.
- Cottrell CB, 1962b. The imaginal ecdysis of blowflies. The control of cuticular hardening and darkening. *J. Exp. Biol.*, 39: 395–411.
- Dai L, Dewey EM, Zitnan D, Luo CW, Honegger HW, Adams ME, 2010. Identification, developmental expression, and functions of bursicon in the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*. *J. Comp. Neurol.*, 506(5): 759–774.
- Davis MM, Okeefe SL, Primrose DA, Hodgetts RB, 2007. A neuropeptide hormone cascade controls the precise onset of post-eclosion cuticular tanning in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 134(24): 4395–4404.
- Dewey EM, McNabb SL, Ewer J, Kuo GR, Takanishi CL, Truman JW, Honegger HW, 2004. Identification of the gene encoding bursicon, an insect neuropeptide responsible for cuticle sclerotization and wing spreading. *Curr. Biol.*, 14(13): 1208–1213.
- Fraenkel G, Hsiao C, 1962. Hormonal and nervous control of tanning in the fly. *Science*, 138(3536): 27–29.
- Fraenkel G, Hsiao C, 1965. Bursicon, a hormone which mediates tanning of the cuticle in the adult fly and other insect. *J. Insect Physiol.*, 11(5): 513–556.
- Gorman MJ, Arakane Y, 2010. Tyrosine hydroxylase is required for cuticle sclerotization and pigmentation in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol.*, 40(3): 267–273.
- Huang J, Zhang Y, Li M, Wang S, Liu W, Couble P, Zhao G, Huang Y, 2007. RNA interference-mediated silencing of the bursicon gene induces defects in wing expansion of silkworm. *FEBS Lett.*, 581(4): 697–701.
- Jaleel W, Lu LH, He YR, 2018. Biology, taxonomy, and IPM strategies of *Bactrocera tau* Walker and complex species (Diptera: Tephritidae) in Asia: a comprehensive review. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25(20): 19346–19361.
- Li L, Ma H, Niu LM, Han DY, Zhang FP, Chen JY, Fu YG, 2017.

- Evaluation of chromatic cues for trapping *Bactrocera tau*. *Pest Manag. Sci.*, 73(1): 217–222.
- Liu XM, Yan SY, Sun CX, Gao DJ, Du MF, An SH, Yin XM, 2015. Molecular cloning and functional analysis of bursicon genes in *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(2): 103–114. [刘孝明, 燕赛英, 孙成贤, 高杜军, 杜孟芳, 安世恒, 尹新明, 2015. 禾谷缢管蚜鞣化激素基因克隆及功能分析. 昆虫学报, 58(2): 103–114]
- Loveall BJ, Deitcher DJ, 2010. The essential role of bursicon during *Drosophila* development. *BMC Dev. Biol.*, 10: 92.
- Loy TV, Hiel MBV, Vandersmissen HP, Poels J, Mendive F, Vassart G, Broeck JV, 2007. Evolutionary conservation of bursicon in the animal kingdom. *Gen. Comp. Endocr.*, 153(1): 59–63.
- Luo CW, Dewey EM, Sudo S, Ewer J, Hsu SY, Hongger HW, Hsueh AJ, 2005. Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cystine knot protein that activates G protein-coupled receptor LGR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(8): 2820.
- Ma XL, He WY, You YC, Li XJ, Xu XF, Hu YL, Yang G, You MS, 2013. Cloning and functional analysis of bursicon genes in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomol. Sin.*, 56(10): 1101–1109. [马小丽, 何玮毅, 尤燕春, 李晓静, 徐秀凤, 胡玉兰, 杨广, 尤民生, 2013. 小菜蛾鞣化激素基因克隆及其功能分析. 昆虫学报, 56(10): 1101–1109]
- Natzle JE, Kiger JA, Green MM, 2008. Bursicon signaling mutations separate the epithelial-mesenchymal transition from programmed cell death during *Drosophila melanogaster* wing maturation. *Genetics*, 180(2): 885–893.
- Richards S, Gibbs RA, Weinstock GM, Brown SJ, Denell R, 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 452(7190): 949.
- Robertson HM, Navik JA, Walden KKO, Honegger HW, 2007. The bursicon gene in mosquitoes: an unusual example of mRNA trans-splicing. *Genetics*, 176(2): 1351–1353.
- Sathapondecha P, Panyim S, Udomkit A, 2015. A novel function of bursicon in stimulation of vitellogenin expression in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 446: 80–87.
- Wang SJ, An SH, Song QS, 2010. Transcriptional expression of bursicon and novel bursicon-regulated genes in the house fly *Musca domestica*. *Arch. Insect Biochem.*, 68(2): 100–102.
- White IM, Elson-Harris MM, 1992. Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. *Environ. Entomol.*, 22(22): 1408–1408.
- Wilcockson DC, Webster SG, 2008. Identification and developmental expression of mRNAs encoding putative insect cuticle hardening hormone, bursicon in the green shore crab *Carcinus maenas*. *Gen. Comp. Endocr.*, 156(1): 113–125.
- Zhang C, Yang H, Yang MF, Yu HP, Zhang W, 2017. Cloning and expression of bursicon gene of *Myzus persicae* (Sulzer). *Fujian J. Agric. Sci.*, 32(11): 1244–1250. [张超, 杨洪, 杨茂发, 喻会平, 张伟, 2017. 桃蚜鞣化激素基因克隆与表达分析. 福建农业学报, 32(11): 1244–1250]
- Zhu B, Liu XM, Du MF, Yin XM, An SH, 2013. Progress in insect bursicon. *Acta Entomol. Sin.*, 56(12): 1469–1479. [朱斌, 刘孝明, 杜孟芳, 尹新明, 安世恒, 2013. 昆虫鞣化激素研究进展. 昆虫学报, 56(12): 1469–1479]

(责任编辑: 马丽萍)